植物組織培養在作物育種上的應用

何　偉　眞
農林廳種苗改良繁殖場

植物細胞、組織、器官在無菌人工培養基上培養，最終目的在得到植株之再生，以便應用於作物繁殖和育種上。目前由於組織培養技術的進步，許多方法已逐漸實際應用於作物的品種改良上，其方法有下列數種：

一、胚培養技術之應用

二、單倍體培養技術

三、胚乳培養產生三元體植物

四、試管內授粉及受精技術之應用

五、誘變育種

六、原生質體培養、融合與遺傳工程

以上各點除最後一項已另文介紹外，分別詳細討論如下：

胚培養技術之應用

由於胚培養方法之進展，對不活性雜種之有效獲得植株，打開一條大路。這些雜種，在正常情況下，由於缺少活力發芽，故在傳統上均予捨棄。有些種子，必須貯藏一段時期，而一般用於克服種子休眠之處理方法，卻又無效者，可因切割及胚培養以克服休眠，始能發芽。另一類種子，必需特殊之光與溫度處理，以打破休眠，胚培養可調節內生之促進或抑制發芽之物質，此二種物質被認爲是調節種子在休眠及非休眠之狀態。對某些種子具有發育不全之胚，研究胚培養之結果，對其不同形態之發生能力，已見端倪。因此，胚培養對瞭解植物中形態發生及其他有關問題，提供了新穎而精確之方法。

一、胚培養技術

Sanders 及 Ziebur 、Raghavan 、Torrey 等，對維管植物胚之切取及培養所使用之一些方法，均有所闡述。在切取胚以及將之移轉於營養基中之過程，均需採用消毒方法。

利用種子，則需將種子剝開，並將胚移轉於培養基中，此爲最簡單之技術。但分離較小之胚，則需整個自胚珠取出，勿使受傷，最好於解剖顯微鏡下，進行此項操作。

最饒興趣者，爲蘭類種子，含有形態學上未分化之胚，相當於雙子葉植物之球形胚。且種子中不具貯藏組織如胚乳，致干擾營養上之研究；種皮則減至膜狀構造。因此，對於蘭類，須將含未分化胚之整個胚珠(種子)，如同胚培養一般培養及處理。

胚培養最重要之點，即為如何選用必需之培養基，以維護胚之繼續生長。雖然，培養胚之營養基，依植物種類而不同，但一般為愈幼嫩之胚，其營養需要愈複雜。因此，相當成熟之胚，可在添加有醣類如蔗糖之無機鹽類培養基中生長；而相當小之原胚，則另需添加不同量之維生素、氨基酸、生長激素、椰子乳等自然胚乳抽出物。由於原胚是在相當之滲透壓下，埋沒於胚珠之汁液中，故培養此種胚，應添加甘露蜜醇等滲透壓劑。當胚在試管中長成再生植物體後，則自原培養基移出，培育於消毒過之土壤或蛭石，於溫室中，生長至成熟。

二、不能成活雜種胚之培養

在討論利用胚培養方法以克服植物中不能成活之問題前，應先瞭解此種異常之原因。在園藝及育種實際工作中，胚發育不全為雜交不成功所獲種子中常遇到之事情。在此種雜交中，雖然受精作用能正常進行，胚亦能以相當正常之方法發育，但終則有極多異常情形發生，最後造成胚死亡及種子萎縮。故這方面的問題，部分需瞭解所發生困擾之種類及其如何變更正常發育途徑，導致胚之發育不全。

1.胚及胚乳之發育

(1)胚之發育，在很多不能成活之雜交胚，發現與胚之發育方式，有密切關係。事實上，一般研究者都認為在早的胚胎期，發育異常即已開始。胚開始生長之速率，並不顯著受影響，但以後，生長即減緩，在多數情形下，終至發育為僅具數個細胞階段而不能成活。

在白松，其雜交能力之主要障礙，即為胚不成活，但硬木松類雜交之失敗，卻為花粉不親和性。觀察下列不孕性雜交：馬其頓松 X 石松、馬其頓松 X 海松、白松 X 軟木松、 白松 X 石松、白松 X 海松等，顯示受精作用雖正常發生，但胚在藏卵器中退化，或當胚柄伸長時擠入頂端組織及進入雌配子體中。總之，此類結果顯示不能成活之雜種胚，具有發育潛力，但被以某種方式防止其達到成長之大小，及達到完全多細胞及構造上之性狀。在某些雜交中，於成功之授粉及受精後，胚之解體係由於自交不孕及雜交不孕所致。

(2)胚乳之發育，提到胚依賴胚乳之營養問題，即知胚乳在不孕性雜種中能發育至何種程度及其持續，為其重要問題。 Renner 首先在一項未能成功之雜交中指出胚乳發育有問題。他指出在月見草種間雜交中，胚之崩潰係緊接於受精後立即發生之胚乳分解，因而剝奪了胚之食物來源。此種在胚乳性狀上之基本發現，已在數種雜交中充分予以證明，胚之退化，可在胚乳仍健全時，即已開始；或隨著胚乳之消失，或於消失之後進行。至於不能成活雜交中之胚乳，究竟需擾亂至何種程度，始無法支持胚之生長，仍未能明白。雖然在很多植物中觀察到胚之不能成活，與胚乳崩潰之開始常為一致性，因而指出此現象部分是由胚乳崩潰之作用。但是，仍不能排除胚乳異常是很多胚不成活因素之一，或是胚乳能對由其他原因所引起胚之不成活，提供刺激物質，而有助於此一過程。

2.胚乳異常之原因

(1)反足細胞及胚之功能：雜種中胚乳異常之基本原因及機制，仍未明瞭，但亦有若干提示。有些學者認為：某些雜交中胚乳之失敗，當由於反足細胞性狀異常之結果，認為其分泌作用改變了對胚乳之營養供給。亦有認為發育中之胚，可削弱胚乳，使其發育異常。在包括 2X 及 4X 親本之柑橘類雜交中，常發現很多無胚種子，卻具正常之胚乳； 另外有些則具胚，但胚

乳退化。

(2)體細胞組織之功能：某些不孕雜種胚珠之細胞組織如珠被及珠心，在其發育中常有異常之情形。有些發育上之異常，因其關係胚之不能成活，而具有重要性。有些不孕雜交，顯示從珠被之表皮即內皮，可形成一種瘻瘤，爲密緻之細胞質層，圍繞胚乳，並擴展至胚盤，成一大團組織。包圍瘻瘤之胚乳細胞，乃漸次毀壞，終至使胚爲過度生長之內皮細胞所包圍。總之，營養不足之胚，其不能成活係由於體細胞向內生長及胚乳生長同時減低所致。

3.雜種胚之培養

由上所述，知胚在缺乏從胚乳連續供給食物，致不能完成其正常發育。由胚與胚乳間之此種唯一營養關係，推知雜種胚充分發育之潛力，必須具有類似胚乳組成之外來營養環境，方足以發揮。從不能成活種子中移出之胚，由其在培養中能成功生長，已可確定此一理論之正確。此節主要在探討從正常未成功雜交之第一代雜種，作胚培養以獲致幼苗之技術。

(1)種間雜種：早期利用胚培養作爲研究工具時， Laibach 曾指出宿根亞麻 × 澳洲亞麻之不成活種子胚，能夠培育至成長爲小苗。此項報告，對發芽前種子中胚不能成活，或種子不能支持胚發育至成長之植物，以研究克服雜交能力上之困難者，甚有幫助。

一些嚐試對成熟早但成活種子少之落葉果樹品種種間雜交胚之培養，開啓了果樹育種研究之路。一般言，蘋果、桃、梨、李等不能成活胚之種子，對平常低溫下之後熟處理，沒有反應。此種情形下，胚培養爲保存具園藝特徵之後代所具最好之方法。且在有些情形下，如開花提早及開花數目等特徵上，由胚培養所生長之植株，較層積法所生長者爲優。在櫻桃×野櫻桃及黑穗醋栗×圓醋栗之雜種，其種子原不能發芽，但在無菌情況下培養其不能成活之胚，可培育其第二代植株。因此，胚培養有助於農業上之果樹育種，及擴大遠緣果樹間之雜交，因其可提高種子之發芽百分率，及提供幼苗選種之途徑。

在作物育種上，利用胚培養以產生具有抗病性狀之雜種上，非常重要。栽培之番茄，通常可被濾過性毒素、黴菌及線蟲所侵害，但野生種之野生番茄則對這些病蟲呈現不同程度之抗力。雖然番茄 × 野生番茄雜種之果實發育正常，但含未發育胚之種子，則不易發芽，但這些種子，利用胚培養，則可培育成雜種幼苗及培育至開花時期。

大麥之育種工作中當普通大麥 × 球根大麥雜種之胚，於授粉後數日即無法在胚珠中生長，如將之移入培養基中，則可恢復正常生長，並形成幼苗。由胚培養，亦可獲得普通大麥、球根大麥、二稜野生大麥、松鼠尾草、短蕊大麥、扁平大麥等之種間雜種。

水稻亦利用胚培養，以繁殖雜交種，使能抵抗不良環境，以及抗病及高產。通常，屬內之種間雜交，在正常穀粒內，僅產生畸形胚。Niles 發現，由水稻栽培品種間雜交之種粒，以無菌方法種於固體之鹽類培養基，胚能生長成可移植之幼苗。如此獲得之植株，對產生雜種水稻理想品系，最具希望。

(2)屬間雜種：關於屬間雜種上應用胚培養技術者，亦於此予以簡述。當 Cooper 及 Brink 在松鼠尾草×黑麥之雜種種子中，雖然能形成具功能之胚，但在授粉後數日即停止生長，而不能達到發芽之地步。但是，從不能成活種子中解剖之胚，培養於 White培養基，可培育爲植株。又由類似技術，可由大麥與黑麥、大麥與海黑麥、小麥與海黑麥、小麥與黑麥、類玉蜀黍與玉蜀黍屬中不同種類間之雜交，而獲得屬間雜種。

三、胚培養及種子生物學

種子生物學爲範圍極廣之學問，包括生態學及生物化學等。此處，不在討論與胚培養有關之發育生理及生化問題，或控制其休眠與發芽之問題，而主要在於討論胚培養方法在某些種子生物學之利用，包括已經在實際應用者，及將來可發展之應用。

1.克服種子休眠

休眠種子爲雖在適當之濕度、氧及溫度下，除非給予適當之打破休眠處理，而無法發芽。依據處理之方法，休眠作用可分爲顯著之幾種類型。因爲在多數情況下，休眠作用機制是隨內藏胚之不能生長情形而定，故在克服此種發育上之障礙而言，胚培養方法之功效，自然值得引起注意。

(1)內生抑制物質：帶鬚鳶尾之種子，收獲後，可休眠數月至數年之久。 Bandolph 瞭解其需要有效方法，以打破其休眠，才能在較短期間內獲致開花，乃研究由胚培養以產生種子，他發現將胚移轉於適當培養基，則於 2 至 3 月後，可獲得根、葉發育良好即可移植於土壤之幼苗。利用胚培養，可使鳶尾由種子到開花之時間縮短至不到一年，而一般則需二、三年，而且，利用胚培養可在一年以內開花之情形，仍未完全發揮其潛力。之後對不同種類鳶尾之胚所作的研究，認爲種子之休眠，是在胚乳、胚或種皮中，存在有穩定性抑制胚生長之物質。在其他植物中，利用胚培養方法，也可克服種子之休眠，使內生抑制物質在這一過程中之主要作用，得以認識。

(2)光：很多種子所呈現之休眠現象，可因光而打破（好光性種子）；但有少數種子，則光可抑制其發芽（嫌光性種子）。好光性種子中，研究最多者，爲萵苣種子，知其完整種子，在黑暗中甚久，亦不能發芽；但裸露之胚，則在黑暗中生長良好。此認爲曝光可分泌分解細胞之酶，而分解胚乳及果皮，致克服胚擴張時之機械障礙。支持此種觀點者，認爲在黑暗中發芽之分離胚，如培育於甘露蜜醇等滲透物質中，可引起再休眠。由胚培養研究，得知光阻礙嫌光性種子如西瓜、水芹草、粉蝶花等胚之生長，及抑制其種子發芽，可能係一類似方法，控制種皮之機械障礙，或干擾氣體之交換。

(3)低溫：很多木本及草本植物之種子，所顯現之休眠，須暴露於低溫下（後熟作用）一段時期，始能打破。要確定冷藏處理效果之有效試驗，必須瞭解自後熟種子切取之胚，在培養時達到正常生長之能力。此類試驗之結果顯示，感應低溫處理之種子，其休眠問題在基本上是與胚生理上之生長有關，其胚在形態上已完全形成。通常，從未後熟種子切取之胚，在培養中不能生長，需要將種子或培養之胚，在最適溫度下，經適當時期之後熟處理後，方能充分生長。

(4)乾燥貯藏：一些普通禾穀類之種子，雖其胚已完全成熟，在收穫後之當時，仍休眠。若將這些種子貯於乾燥溫度下，則漸漸克服其休眠，可開始發芽。另外很多種子，直到貯藏數年之後，才能達到充分之發芽力。此種休眠，栽培者係一大困擾。在收穫後之不同時期，培養野燕麥休眠種子之胚，得知分離休眠胚所遭致之失敗，可於培養基中加添 GA ，而予以克服。因此，在適度添加激素之培養基中，培養休眠穀實之胚，對於在收穫後立即從禾穀類穀實培養新的一代幼苗，頗具利益。

(5)未成熟胚：蘭類種子內藏胚，在球形期後幾乎不發育，此種未熟胚遂引起一種休眠，致種子

脫落。胚在形態上之發育及以後在土壤中之發芽，與所謂菌根中之眞菌有關。Knudson 在缺乏共生眞菌之情況下，將蘭類之胚培養於含糖之洋菜培養基，能使之發芽爲植物體。缺乏糖時，胚不能發育超過芽球時期。目前在商業上，此種非共生蘭類之繁殖方法，已至實用階段。

2.縮短植物育種循環

在育種實際工作上，當種子因休眠及幼苗生長緩慢，需長期之育種季節，則對生產者言，胚培養可縮短新品種之育種循環，甚爲有利。薔薇的栽培品種，通常需要一年才能開花，2 至 3 個月結實。雖然從種子切取胚，爲一相當乏味之操作，但來自培養胚之幼苗，在 2 至 3 個月內即能開花。這些花又可作爲父本，再行雜交，因而使育種者在一年內產生二個世代，亦即縮短育種循環至 3 到 4 個月。此種胚培養勝過種子之緩緩發芽及幼苗之緩緩生長情形，在海棠中亦可看到。此種植物之胚培養，在 9 個月內可得到高約 4 呎之幼苗，約爲種子在土壤中發芽之時間。

另外有些資料，是關於某些早熟果樹種子之發芽，此種種子成活力低，雖在適當後熟處理後，仍不能發芽。通常，從此種種子切取之胚，在試管中可正常地發育爲健全之植株。因之，利用胚培養，可保存這些品種，以發揮更早熟果實之性狀，此性狀對育種者有實際應用價值。

3.克服種子之自交不孕

傳統上以營養方式繁殖之作物幼苗，希望以胚培養方法培育之，應有可能。在這類植物中最標準之例子，爲香蕉。香蕉中，有很多具種子之品種。短果香蕉爲與商業香蕉親緣極近之野生種，其種子本質上不發芽，但如將胚切下，培養於簡單之鹽類培養基，則可很快獲得幼苗。此種種子自然之不孕阻礙，可藉胚培養而予以克服。

4.專一性寄生種子之發芽

以傳統方法要使專一性之顯花植物根寄生及莖寄生，在不與寄主接觸之情況能夠發芽，已證實爲不可能。近年來，數種專一性寄生之種子及胚，可在無菌情況下生長，以研究其對寄生刺激物質之依賴性。由於某些寄生取食於經濟作物，並造成破壞，故對胚形態發生之瞭解，甚有價值。

專一性根寄生中研究最廣者，爲玄參科之一些種類（如熱帶玄參屬鬼羽箭、火燄草、獨脚全）、列當科（列當、肉從蓉）、檀香科（檀香）。當種子發芽時，胚之一端伸出芽管，外表上有似幼根。此管穿過寄主根部，因膨大及增殖而發育爲吸器。有些研究指出，在不與寄主植物實際接觸之情況下而於培養基中添加寄主根部之分泌物，爲似激動素之香豆精型化合物，以及添加 GA 、乳酪水解物及椰子乳，或是曝於光下，亦可誘致種子發芽。因之，一般認爲寄主似乎供給寄生種子一種激素類型或氨基酸之特殊物質，這些物質係控制著發芽。

專一性莖寄生主要屬於槲寄生科、兔絲子科及樟科。與根寄生之胚相比，莖寄生之胚成爲一團，而且，並不具一般根系，而在幼根之尖端具有吸器，與寄主植物形成嫁接。從下列數種莖寄生切取之胚，能在培養中生長到再生植物體階段：兔絲子、槲寄生、砂蔓、毛桑寄生、桑寄生、馬來桑寄生、矮槲寄生、野蔓。培養很多種類之胚，一般認爲培養基中，必須添加乳酪水解物，方可誘致其生長。雖然有時候，除乳酪水解物外，再添加生長素及其他成分，但 IAA 對矮槲寄生胚之生長，絕對有抑制作用；對砂蔓之胚有相當程度之抑制作用。

5.種子試驗

在種子試驗項目中，胚培養方法為決定許多種子成活能力之快速工具。Tukey 在桃之未後熟種子切取胚之生長點，與後熟種子之發芽二者之間。找出密切關係，他推想隨機選出成熟或未後熟種子之胚培養作指標，以決定早幾週種子發芽之栽植價值。此工作包括後熟處理之正規發芽試驗，需為時數月完成。從實際應用觀點言，育苗者能利用這個作為快速測驗，以瞭解為特別種植日期所供應種子之發芽能力，因而減少因種植低活力種子所造成之失敗，及瞭解已知發芽能力之種子其商業上的流動情形。在印度測驗當地原產玉蜀黍樣品時，發現來自皺縮種子之幼苗，在正常發芽過程下，以及由胚培養方法者，其生長情形均類似。此為利用胚培養方法，測驗種子穀粒種子樣本之活力。利用胚培養方法，亦可知冰點時之冷藏，能保存玉蜀黍幼嫩未熟胚之活力。在種子實驗測驗上，以廣泛地利用胚切取方法，因為已知數種松柏類、灌木、藤本及果樹等種子之活力，均由此法決定。

單倍體培養技術

單倍體在植物育種及遺傳學上有其特殊之重要性。單倍體植株的來源不外是天然發生及人為方法誘導之。在人為方法中，以組織培養技術，由花粉或未受精之胚珠培養而獲得，最具發展潛力。對於異交作物而言，如十字花科蔬菜、瓜類等，利用單倍體育種法，可大為縮短自交系育成的年限。對於有害的隱性因子，也可儘早發現，加以剔除。另外在誘變育種之研究中，基因的變化則可立刻察覺。對於自交作物如豆類，在兩品種間之第一次雜交後，用單倍體育種法，可迅速經染色體倍加而育成超級的純系。因此，如何提高單倍體育成之頻率及如何倍加，以供育種上之利用極為重要。

植物的單倍體於 1922 年首先在 *Datura stramonium* 被發現。到了 1960 年代之初期已有 71 種分別歸於 39 屬、14 科的植物中發現有單倍體存在。近二十年來，許多技術，尤其是植物組織培養技術的發展，使包含於 88 屬、34 科之 247 種植物中，有單倍體的報導。Guha 和Maheshwari (1964年) 是第一個利用花藥培養技術培育出單倍體的植株。此後，植物體具有單套染色體的細胞和器官，包括花粉 (花藥) 和胚囊細胞 (胚珠或子房)，即刻成為從事單倍體育成者的培養材料。

一、單倍體的獲得與利用

為了研究和實用上的需要，除了自發產生的單倍體之外，亦應用許多方法誘導單倍體植株產生，茲條列如下：

(一)In vivo 方法

1.延遲授粉，或除雄後隔離，使受精作用受阻。

2.用 X- 射線照射過的花粉或種間、屬間之遠緣花粉授粉，使產生偽受精 (pseudogamy) 作用。

3.半受精 (semigamy) 現象之利用。

4.染色體去除法。

5.由雙生苗中挑選單倍體植株。

6.用物理或化學方法處理花粉或植株，以阻礙正常受精行爲。

(二)In vitro 方法

1.花藥（花粉）或子房（胚珠）的培養法。

2.單倍體植株之器官、組織、細胞或原生質體培養法。

此 in vivo 方法爲應用植物組織培養技術，將含單套染色體細胞者行人工培養， 以誘導單倍體植株之產生。其成功的例子不少，將來發展的潛力更大，爲目前獲得單倍體植物最常用的方法，亦爲本文探討的重點。

單倍體只含有一套染色體，作爲遺傳與育種上之研究和應用確有其便利之處。單套染色體組成，其基因的表現不受顯隱性之控制。因此，對於誘變的顯示、基因的作用與發展、進化和細胞遺傳方面的研究等，單倍體植物都爲最佳之供試材料。在實際育種工作上的利用，則具有下列優點，使育種者極欲採用。

1.快速育成自交系，避免自交劣勢，縮短育種時間。

許多異交作物自交系的育成，需經數年之自交，若再發生自交劣勢，例如十字花科，則植株生長極弱，自交系的育成費時又費力。單倍體植株經染色體倍加後，即刻成爲同質的二倍體，相當於極固定或純化的自交系。因此，爲育種者節省了不少的勞力和時間。

2.供誘變育種與選種之研究與應用

單套染色體使基因的表現不呈顯隱性關係。從事誘變工作時，隱性基因的突變很快就能被察覺到。同樣地，有害的隱性基因，亦能很快被偵測到而予以摒棄，使選種工作更易執行。

除此之外，在種間（inter varietal）或遠緣雜交育種工作中，利用花藥培養技術亦被認爲可加速選種效率及優良基因組合。傳統育種行多品系間之雜交時，其早期雜交後代性狀分離廣，且易偏向兩親，使選種效率不彰。運用新的育種程序，亦即每次雜交後，接著進行花藥培養，選出優良株系，並倍加其染色體，使之與第三親雜交。如此重複下去，可很快地把數個不同親本的優良性狀集合爲一，且避免雜交後代之性狀因偏向父、母兩親分離而降低選種效率。此亦能克服遠緣雜交所引起之後代不稔問題。

二、花藥和花粉培養

花粉爲含單套染色體之雄性細胞，數量多，分離培養容易，爲最受重視的單倍體來源。被子植物通常爲摘取含花粉之整個花藥進行培養，成功率較高。現就花藥培養時單倍體之發育及影響其成敗的條件分析於後：

I.培養條件

(一)生理因素

1.花藥來源母株（donor plant）之生理狀況

(1)母株之基因型：同種之中，不同的基因型或不同栽培種對花藥培養時，單倍體誘導的成功率不一。有些品種完全無反應，有些品種則極易誘致花粉產生單倍體。

(2)母株之生長環境：母株種在田間或溫室中，所採得的花藥，其培養之成功率常大不相同。不同的日照強度、溫度、日照長短等，在在影響母株的生育情況，因而影響了所摘取之花藥在培養基上的反應。此亦意味著季節能控制母株的生理和生長。如能以人工氣象室

，給予母株最適宜的生育環境，則能預期獲得較佳的結果。例如，油用油菜（*Brassica napus*）在 16 小時日長，10～15℃ 下生長的母株，最適於提供花藥作爲培養材料。而光照強度爲 3,000 燭光，則比 750 或 1,500 燭光更適於 *Brassica campestris* 母株之生育。

(3)母株之生育年齡：一般來說，在開花初期所採得的花藥比後期者更適於培養。

(4)花粉的發育時期：花藥或花粉採集時花粉的發育時期爲最重要的影響因子之一。以蕓苔屬蔬菜爲例，則培養單核期的花粉最好，如時期略晚，到進行第一次細胞分裂之花粉，則獲得單倍體的機率大爲降低。適合培養之花粉發育時期，各種作物不盡相同，需由實驗觀察判定之。

2.花藥的前處理

整個花序、整朵花或已切離母體之花藥，在正式培養前先經高溫或低溫處理，可以提高花藥培養的成功率。實驗指出低溫前處理，有助於小胞子進行均等之細胞分裂，導致癒合組織或擬胚的形成，進而誘導植株發生。處理方法爲在普通冰箱中放置數小時或數天，視作物別而異。例如 *B. juncea* 之花序在 10℃ 下放置 2～15 天後，才摘取花藥培養，對於小胞子的擬胚發生（microspore embryogenesis）有提高之現象。但是低溫前處理被認爲有礙於 *B. campestris* 之花藥培養。 對青花菜（*B. oleracea* var. *italica*）而言，花藥以45℃ 先前處理 1 小時，接著用 40℃ ，前處理 3 小時， 能有效促進小胞子之胚發生。此外，花藥之減壓（500 mmHg 半小時）前處理，亦能刺激 *B. hirata* 之小胞子發育爲植株。

(二)營養因素

培養基的組成分，對小胞子的分裂、生長和發育影響很大。培養基的鹽類成分不能太高。若使用 Murashige 和 Skoog (1962) 的配方，多半減爲半量，改良的 White (1963) 及 B_5 或 N_6 配方(1978)也都有相當良好效果。蔗糖的濃度亦爲重要的因子。三細胞花粉 (tricellular pollen) 例如十字花科及禾本科的植物，其花藥培養所需的蔗糖濃度在2～5％左右。至於茄科植物之花粉釋放時，只含營養核和生殖核爲典型的雙細胞花粉 (bicellular pollen) ，則花粉培養所需的蔗糖較多，大約在 6～15％之間。

其他的成分如高濃度的 inositol 和某些胺基酸如 glutamine serine 等，以及有機成分包括椰子汁、酵母抽出物或酪蛋白水解物等的添加，都對小胞子的分裂和發育有益。

花藥壁對花粉培養的成功與否亦扮演極爲重要的角色。一般推測，花藥壁內的 tapetum 細胞，提供了花粉早期生長與發育的重要物質，因此帶著藥囊的花藥培養，比單獨的花粉培養容易獲得植株的再生。

除此之外，培養基內 Auxin 和 Cytokinin 的濃度適度與否，亦有決定性的效果。

(三)物理因素

物理因素中影響花藥培養之結果的有培養瓶的大小、瓶內的空氣組成、花藥或花粉粒的密度、花藥放置的方式等。Sopory 和 Maheswari 發現花藥平放於培養基上效果最好。液體培養基比固體培養基效果好。培養瓶內二氧化碳和乙烯的濃度也可能有某種程度的影響。而培養條件中溫度和光線的效果則因作物而異。

II. 花藥培養所得植株之染色體情況

植物花藥內小胞子之染色體為單套，但是由小胞子培養而得的植株除了單倍體外，常出現高比例的非單倍體植株，包括二倍體、多倍體、混合倍數體 (mixoploid)及非整倍體植株。Keller 等人，培養 *Brassica campestris* 的花藥，所得的植株全為二倍體和多倍體，並無單倍體。 究其原因可能為核融合 (nuclear fusion) 或核內有絲分裂 (endomitosis) 所致。 某些作物可能來自未減數之小胞子發育而來。至於非整倍體植株，可能是由於有絲分裂或染色體行為異常所導致。

三、子房和胚珠培養

單倍體植株的另一來源即為子房和胚珠培養。在技術上言之，摘取子房和胚株比花藥和花粉難些，且數目亦少很多。目前研究和利用的情形並不普遍，在蔬菜上只有甜菜和萵苣已經有成功的報導。在禾本科方面的研究則指出由子房或胚珠培養所得的白苗植株數比花藥培養低很多，因而增加了研究的重要性。

子房或胚珠培養時，單倍體係發育自胚囊內含單套染色體的細胞。由目前累積的實驗數據顯示，多半為輔助細胞 (synergid) 和未受精卵 (unfertilized egg) 行細胞分裂而來，中央細胞 (central cell) 和反足細胞 (antipodol) 則很少分裂，胚囊內細胞經有絲分裂形成癒合組織和胚狀物，最後發育為植株。通常培養條件最適宜時，一個胚囊只會發育一植株，否則也會形成數個植株。

子房和胚珠培養所需注意的條件也與花藥培養相近。胚囊以接近發育成熟之時期培養效果最佳。萵苣乃成熟胚囊 (內含已融合之極核) 最適於培養。至於培養基的鹽類、生長素、蔗糖 (3～12%)、有機物等之添加，目前所知有限，多半比照花藥培養的條件再予改良。胚珠或子房之低溫前處理對某些作物亦證實有益，然在萵苣之實驗則得到相反的結果。

子房和胚珠培養的成功率，也受到品種特性的左右，通常介於3～19%之間， 而白化苗則較少發生。所得植株的染色體倍數亦有很大的變異，包括單倍體、二倍體、多倍體、混合倍數體等等，與花藥培養的結果類似。

四、單倍體植株之器官組織、細胞或原生質體培養

單倍體植株除了可由雄性部位之小胞子及雌性部位之胚囊內細胞誘得外，取已經存在的單倍體植株之器官、組織、細胞或原生質體進行培養，亦可以獲得大量單倍體植株。惟這些植株是由無性繁殖而得，理應具有相同的遺傳質。在育種上言之，這批營養系不具有選種價值，但可供作多方面的評估和利用。因此與子房和花藥培養誘得單倍體之意義不同。

五、單倍體植株染色體的倍加

單倍體植株具有不孕性，因此必須先將染色體倍加為二倍體，才能生產種子，供育種者利用。當然，有些作物，例如某種花卉，單倍體小巧又不孕的特性，使花期延長，供人們觀賞之時間長，亦可直接利用。然而，大多數的情形下，所得的植株必須先經細胞學或植物學之方法判定是否為單倍體。已確認的單倍體，再以適當的方法來倍加染色體。 可靠的方法應具備(1)安全、簡

單、快速之特性。(2)可以處理大量的植株。 (3)不產生生理障礙及基因型之選拔效應。(4)遺傳組成不受到傷害和改變。(5)處理後之植株全爲二倍體，無其他倍體出現。(6)適用的範圍很廣。(7)效率高且重複性(repeatability)亦高。

染色體倍加的方法有下列數種：

(一)自然倍加法

未經任何處理之單倍體植株，有時也會倍加染色體成爲二倍體。第一種情形爲單倍體植株生殖細胞之染色體自然倍加，亦即產生具單套染色體之正常配子，則自交可能得到少許二倍體種子。第二種情形爲單倍體植株（胞子體）上某一新芽生長點細胞發生染色體倍加，長出二倍體的新芽，此芽條成熟後正常開花產生二倍體種子，或用無性繁殖方法繁殖之。這二種情形發生比例很低，對育種者來說是可遇而不求的，不得視爲有效方法之一。

(二)人工誘導染色體倍加

用人工方法旨在有效提高染色體倍加之頻率，已開發出的方法有下列數種：

1.誘導癒合組織和植株再生

在單倍體植株上利用割傷或不斷去掉頂芽及側芽，刺激受傷部位產生癒合組織或新芽，可大爲提高二倍體植株之發生率。植物體割傷後若輔以生長素處理傷口，也有報告指出其效果更佳。最上乘者爲利用試管內培養技術，亦即切取單倍體植株上部分器官或組織，進行癒合組織或細胞懸浮培養以再生大量植株， 可獲高比例的二倍體植株。例如， 菸草葉肉細胞培養之再生株中有67% 爲二倍體；根部培養亦有 59% 爲二倍體。 培養基內添加秋水仙素，更可提高二倍體產生的機率。然試管內培養技術僅適用於有已開發之技術可資援用的植物種類。

2.化學藥劑處理法

化學藥劑處理之研究中以秋水仙鹼被研究得最多。秋水仙鹼有許多形式存在，每一種幾乎都有類似的效果。其衍生物如 N-carboxyethyl-deacetyl-thiocolchicine 效果更是顯著。秋水仙鹼爲細胞分裂時紡錘絲形成的抑制劑，它使染色體停在 metaphase，不向 anaphase 進行。所有同功用的抑制劑均與秋水仙鹼有相同的作用。 其有效之使用濃度介於 0.0006～3.0% 之間，配製於溶液或羊毛脂中使用。每次宜使用新鮮配製者，且其 pH 值也會影響藥效，一般爲 5.0 左右。配製水溶液時多半用 (1)稀釋酒精溶液。(2)10%之甘油水溶液。(3)3～4%之 dimethyl sulfoxide 作爲溶劑等。 固態則配製於洋菜，凡士林或羊毛脂中。

秋水仙鹼有引起誘變之副作用，因此使用後應詳細檢查每棵植株之染色體及性狀。此外，用秋水仙鹼之處理時亦常發生鑲嵌 (chimera) 現象。 然而秋水仙鹼之處理仍不失爲目前可靠而又實用的方法之一。

除了秋水仙鹼外，能使染色體倍加的藥劑尙有 podophyllin、acenaphthene、nitrous oxide 和某些植物生長素如 2,4-D 等。其中 N_2O 爲氣體，常用加壓方式處理， 處理後殘留量幾乎爲零。

對於染色體之倍加處理，尙需考慮品種遺傳之穩定性、處理時植株之生育期及環境等因子，才能掌握成功之契機。

六、單倍體誘導之限制

利用組織培養技術誘導單倍體產生雖爲目前最具實用潛力者，但仍存有許多瓶頸，極待克服。首先爲成功之植物種類不多，侷限於茄科、十字花科和禾本科植物。其次爲白化苗產生的比例仍偏高。有待生理及遺傳上之探討，謀求解決之道。而單倍體誘導的頻率低，且結果不穩定則爲共同的現象。這些限制因素尙需學者致力解決。

胚乳培養產生三元體植物

胚乳爲一奇特之組織，在多數被子植物中（超過 81% 科），爲三個單元核融合之產物，是爲三元體。胚乳爲胚之主要營養組織，亦爲影響胚發育之中心。胚乳之缺乏或其功能喪失，將造成胚之不能成活。胚乳可在胚發育過程中爲胚所消費掉，致成熟之種子無胚乳；或是以澱粉、脂肪或蛋白質形態，成爲豐富之貯藏食物而永存。在種子發芽時，這些物質乃被消化及利用，以供幼苗生長，直至幼苗發育葉綠素，能行光合作用，製造其食物爲止。

在過去十年中，試管內研究胚乳組織在器官發生及分化作用之潛力，即已建立。由於胚乳組織爲三元體，故由此所形成之再生植物體，亦爲三元體。三元體在植物改良上之價值，早已知悉。此可利用以研究果實之無子性質，尤其是像果肉中包藏無數種子之西瓜。在商品上，有些植物之三元體，較二元體及四元體爲優異。另外，也可利用以獲致遺傳圖上之單價體品系。就植物育種者言，胚乳培養技術提供了產生三元體之新方法。

首先將討論胚乳組織中之生長及分化，然後再討論利用胚乳培養技術以產生三元體之可能性，以及與植物改良之關係。

一、胚乳組織之癒合組織發生作用

在過去十餘年，已從數種雙子葉植物之成熟胚乳建立連續性生長之組織，至今，發現植物具良好反應者，係屬於大戟科、槲寄生科及檀香科。就前兩科言，發現要誘致增殖作用，胚之起始關係非常重要。在胚乳開始發生癒合組織後之短期內，可將胚移走，而不致影響組織之生長。當成熟胚乳及胚完整地植於適當營養基中，則胚呈現初期之發芽，如胚莖之伸長及子葉之擴張。如在此時期不移走，則胚亦可增殖，而形成胚、胚乳混合之癒合組織。因此，在胚乳細胞開始分裂之後，最好立即將胚移走。

二、器官發生

由 Johri 氏等研究報告之激勵，乃廣泛研究經由胚乳培養，以產生完全之三元體植株。目前，由胚乳培養所進行之器官分化作用，已在下列各植物中完成：日日櫻、水稻、香皮樹、假黃楊、槲寄生、松寄生、楔葉松寄生、澳洲檀香、桑寄生、毛桑寄生等。其中，前四種爲自營植物外，餘均爲半寄生植物。

在胚乳培養中顯示有器官分化作用之自營植物，有禾本科之水稻及大戟科之日日櫻、香皮樹、假黃楊，這些植物中，其器官之分化作用，係發生於已進行癒合組織作用之胚乳。日日櫻及香皮樹之癒合組織，在添加有 2,4-D 、激動素 (cytokinin) 及酵母抽出物之培養基中，生長最好

；但是，在此培養基中，組織仍不進行器官發生。如將之轉移至基本培養基，香皮樹之胚乳癒合組織，乃形成無數之根。假黃楊之胚乳癒合組織，以在添加有 IAA、激動素及乳酪水解物之培養基，生長最好，已如前述。且在同一培養基中，癒合組織呈現結節狀外貌，隨即進行器官發生作用。8週之後，約 80% 之培養形成芽。在次一 8週內，枝梢達 4 公分長，具 3 或 4 對葉。在約20%之培養基中，根、枝軸十分明顯。這些源自胚乳之再生植物體，仍須成功地移植於土壤。

有趣者為由胚乳組織分化之器官及再生植物體，為三元體。在形態上及解剖上，能與由接合胚形成之植株相匹對。

三、三元體在植物改良上之重要

三元體通常為種子不孕性，對於在商業上種子很重要之植物，則很討厭。但是，在有些情形下，由三元體造成之無種子，並無重要關係，有時反而有利。對於這些植物，三元體可用作植物改良。如某些品種之蘋果、香蕉、桑、甜菜及西瓜。

三元體之美洲楊，較其二元體具更理想之木材性質。此植物之種子不孕性，並非嚴重之缺陷，因其易用營養方法繁殖。同樣，以生產營養部分之作物，三元體之缺乏種子，反倒優異。如果植物不能以營養方法繁殖，則產生困擾，而需重複生產三元體種子。生產三元體種子最普遍之方法，為將四元體與二元體雜交。在不同情形下，此種雜交或許不成功，致不易產生三元體種子。若發生這種問題時，則需採用其他技術。

由上所述，知可由胚乳培養，大量產生三元體植株。現在，育種者正利用胚乳培養技術，對凡不能用傳統雜交四元體及二元體方法之經濟上重要作物，均由此產生三元體。

試管內授粉及受精技術之應用

授粉為自花藥將花粉移轉至柱頭。在植物體上，此過程是由各種不同之媒介所完成。在正常方式下，因授粉而發生各種過程：花粉粒於柱頭上發芽；花粉管生長，並經由柱頭、花柱、胎座，終至將不動之雄配子帶至子房內所封閉之胚珠；二雄配子乃在胚囊內釋出，一與卵核結合，另一與次核結合；因此，受精作用完成。多數被子植物為遠親繁殖，故不能自花授粉。同樣，自然之種間及屬間雜交，亦甚稀少。但是，在植物育種工作上，自交及雜交都是獲得理想結果最熟知之方法。因之，凡是能完成自交及雜交之技術，實際上極為重要，試管中授粉及受精，即為此技術之一。

此項技術，當為育種上最有力之工具。

一、技術

達到試管授粉、受精及果實發育，基本上有二步驟：(1)在正確時期利用花粉粒及胚珠，(2)決定適當之營養基，以支持最好之花粉發芽及花粉管生長，並使種子發育至成熟。基本上，此包括對實驗材料花體生物學之各項植物體中之研究：(1)開花，(2)花藥之裂開，(3)授粉，(4)花粉發芽，(5)花粉管生長及進入胚珠，(6)受精，(7)種子成熟。

此處對花粉及胚珠之採集方法，與培養之做成，僅稍加討論。要在無菌情況下採集花粉，最好自早經選妥之花芽，以無菌方法切取正待裂開之花藥。若花藥需從花部切下，則切下之花藥，

應作表面消毒。不管在上述那種方式之下，均須使切取之花藥，在消毒容器內之適當基質(如濾紙)上裂開，容器可用培養皿。如此獲得之花粉，即可用於試管授粉。

為防止可能在植物體上已授粉，在開花之前，花芽需去雄（在兩性種類），並套袋。在雌蕊之培養中進行柱頭授粉時，在開花前一日或當日，採集已去雄及套袋之花芽。而且，所有下述操作，均須在無菌箱中進行。首先，除雌蕊（包括花梗）外，需將花芽各部剪開，雌蕊宜用液劑作表面消毒，但勿濕及柱頭，並將雌蕊小心拭乾（花梗適度剪短），將已備妥之花粉於柱頭授粉。最後，將已授粉之雌蕊嵌植於消毒之洋菜營養基。開花前切取之雌蕊，維持在無菌培養中，直至授粉完成，並迅即放回培養瓶。然後將培養置於光線、溫度，甚至濕度之控制情況下，使之生長。

為進行試管中胎座及胚珠授粉，通常在開花之日，以無菌方式將胎座及胚珠切取，將備妥之花粉，在無菌情況下置於胎座或胚珠之上。應用花粉之方法、用量及花粉種類，依實驗目的而定。

試管中受精作用一旦成功，通常即將受精之胚珠，即初發之種子，轉移至已證實適當之不同營養基，培育幼種子至成熟而能成活之境地。

二、結果及應用

當子房內授粉成功後，乃研究試管中切取胚珠之授粉，是否可成功。此種試管授粉及受精之技術，為印度德里大學 Kanta 等提出。 氏等且認為在植物育種及遺傳上，可能有應用價值。提出這一技術，對選用虞美人作材料，頗具意義，因為虞美人缺乏花柱，如此，花粉管從柱頭生長到胚珠之距離甚短。甚至此種長度，但由於在無菌情況下切取胚珠，並將之與花粉粒在試管中培養一起，乃更形縮短。因此，對於試管中授粉、花粉發芽、花粉管生長、花粉管經珠孔進入胚珠、受精、胚發育、結有胚乳能成活之種子及種子發芽等，均在試管中進行，且如同在植物體中一樣正常。

試管授粉及受精技術應用之另一途徑，為克服自交不親和性。關於自交不親和性之細節，將於次節討論，此處僅涉及必需之基礎。自交不親和性為生理上之障礙，可阻礙性別上不同配子之融合，但此卻為同一異型胞子種類個體所產生而在他處為可孕性之配子。在同型有花植物中，自交之障礙通常為柱頭上（在胞子體系）花粉發芽受到抑制，或在花柱中（配子體系）花粉管生長受到抑制。而試管授粉受精技術，卻在無菌情況下於人工營養基中，將花粉及胚珠帶到一起，而消除這些不親和之區域。但是，在某些供試之植物中，柱頭上試管自花授粉及試管培養切取胚珠之授粉，均無助於克服自交不親和性。故此種試管授粉之基本技術有待改進。已改進之技術，稱為胎座授粉（有別於柱頭授粉及分離之胚珠授粉），已證實在自花矮牽牛中克服自交不親和性，有顯著成功。在胎座授粉中，並不對試管中分離之胚珠或胚珠群授粉，而是一個子房內全部胚珠在胎座上整個培養，將花粉粒散落在整個胚珠團。此技術有助於保持試管中之胚珠，與原來胚珠在胎座上之排列（在植物體中）相同，因之可防止手術上一些有礙花粉管進入胚珠之傷害。胎座授粉後，花粉粒在 3小時內發芽，花粉管在胎座上之裸露胚珠中充分生長，於培養一天後，花粉管已進入胚珠；二天後，很多胚珠已受精。七天後，幼的種子變為粉白色，類似來自生物體中或試管中異花授粉之同齡種子。在胎座自花授粉後24小時，已形成具有雙子葉胚及正常胚乳之成熟種子。由胎座自花授粉在試管形成之種子，在田間亦已長出F_1植株，且如同親本一樣，其子代均為

雙元體，可孕性，及自交不親和性。而且，經由同一胎座授粉技術，F_1中之自交不親和性亦已克服。在胎座授粉克服自交不親和性獲得成功後，對植物育種已開闢新的研究途徑。

試管授粉之第三種應用，為誘致產生單元體植株。單元孢子體在育種上之重要性，是最大的，因為只要加倍其染色體，即可獲得同質雙元體。雖然獲得單元體之技術很多，如延遲授粉、分開雜交、與死滅花粉或照射過花粉授粉、理化方法處理子房、及最近花藥培養等，但誘致單元孢子體之情形仍甚少，且難於控制。最近，Hess 及 Wagner 指出由花藥培養試行建立黃花溝酸漿(玄參科) 之單元體，未能成功，但是將其胚珠團塊在試管中以花公草(玄參科)花粉授粉，則培養中產生 1% 之單元體再生植物，並能成功地移植於土壤。這些再生植物並非溝酸漿 X花公草之雜種，就染色體之數目、花瓣中花青素之含量，及各部分(包括分離之原生質體)之大小上而言，均顯為胚珠親本溝酸漿之單元體，所有這些性狀及大小，均為正常雙元體溝酸漿之一半。

三、結論

雖然試管受精技術為新近所採用，但其在應用及基本植物學上之用處，已引起注意，故知有極大之潛力及光明遠景。例如，胎座授粉方法，在自交或雜交尚未成功之體系中，應屬有效，此自交或雜交之不能成功，或為柱頭上花粉發芽之抑制 (尤其在處理過柱頭之後) ，或因花粉管無達到子房之能力。而且，在研究誘致單性生殖作用及突變之研究中，已知胎座授粉技術，提供好的控制方法及可僅僅處理雌方 (胚珠) 之工具，因為此技術有助於在胚珠團塊之一定位置，直接撒置理想之花粉，或化學誘變劑。同樣，利用花粉管培養作試管授粉，對以物理或化學誘變劑僅僅處理雄方 (花粉管內之配子) ，提供方便之方法。

在眞合生之雌蕊，花粉管通過之柱頭組織，在所有之心皮言，均為相同。因此，由花粉粒生出之花粉管，不論置落於柱頭之任何一點，均能使生長在胎座上之任何胚珠受精。於是，在對雌蕊之實驗研究上，整個子房，主要是胚珠，須在處理之下。因此，對同一雌蕊內之胎座，作不同處理而能使樣品之變異有效地減低到最小者，在研究授粉及不親和性上，具特殊價值。在這方面，胎座授粉及隔膜間插入玻璃紙之技術，非常重要。同樣，試管受精技術應予鼓勵以取代精細之操作，如花柱嫁接、縱列嫁接、殘部授粉，這些總不易完成，或在田間無法完成。

由於 Hess 及 Wangner 最近由試管授粉技術上獲致單元體植物， 而非由花藥培養獲致，故試管授粉技術在那些花藥培養失敗之例子方面，其應用更值得鼓勵。由試管授粉，使得花粉粒及其所貯生長促進物質，較之其他授粉方法，更與胚囊密切接觸，有助於刺激卵細胞進行單雌生殖。事實上，在試管受精技術上，植物育種者具有有力之工具，以較過去為容易之方法，實現其培育較遠之雜種及同質結合植株。此一技術，連同最近已證實在獲得種間雜種及誘致自交親和性能成功之認同花粉 (recognition pollen) 方法，對研究在植物體人工授粉不易成功之體系，具有加倍之價值。栽培作物以其推定之親本與野生近親植物雜交，為研究作物改良上之基礎，試管授精在這方面已證實極有用處。

試管授粉及受精在基礎問題上如受精前、受精時及受精後之胚珠生理學方面，其技術價值，不宜過分重視，應用此一技術以培育裸子植物及被子植物間之雜種，為一有趣之工作，且對有花植物之起源問題，或能給予解答。

植物組織培養在誘變育種上的應用

誘變育種為創造作物新遺傳變異的有效方法。藉著植物組織培養技術，不但能增加突變個體發生的種類和發生頻率，亦能經由培養和培養環境的選擇而控制變異和選種的方向。利用生物技術和遺傳工程技術，則更能控制遺傳的變異行為。此外，組織培養技術的選用也能相對提高誘變處理的效果，有利於獲得無鑲嵌現象的變種，供直接利用或當作育種材料，對作物之品種改良，助益頗大。

一、前　言

誘變育種的實用性，過去曾頗受爭議。隨著科技的進步，誘變育種的功用日漸被肯定，尤其對於行無性繁殖的作物，其染色體一般為高度異質結合，常為多倍體，有時伴隨不稔之性狀，使得傳統之育種行為倍增困難，因此誘變育種乃成為無性繁殖作物品種改良的利器，許多新品種都源自於體細胞的突變。

誘變育種可用以獲得同品種內自然界原先所不存在之新的變異，藉以增加育種者種源的遺傳因子。但誘變育種方法亦有其限制，諸如：變異的方向難以控制、不良變異的比例偏高、常出現無法經由有性世代遺傳的鑲嵌變異個體等等。但是，若配合植物組織培養技術，這些限制均得以減輕。

二、誘變育種的理論基礎

植物突變種的獲得主要有兩種途徑，一為自發突變，一為人為誘變。在植物組織培養過程中，變異的產生也是經由此二方式。自發突變可能是植物體內所產生的代謝物引起基因的變化所致，此又稱為自動突變 (automutagenesis)。人工誘變則包括以化學的、物理的及生物等方法導致植物遺傳物質的改變。化學藥劑如 EMS (ethyl methane sulfonic acid)，秋水仙素等；物理方法如 X射線、珈瑪射線、中子、放射性同位素等；生物方法如高溫處理、加齡種子、遠心力處理、老熟的花粉受精等，都可以誘致突變個體的產生。

植物組織培養技術應用於無性繁殖作物的營養系繁殖時，通常希望獲得遺傳物質與母株完全一致的後代。但是各種不同的變異株，卻由於自發突變而在所繁殖的後代植株中被尋獲。除此之外，配合人工誘變劑的處理，也可獲得許多突變個體。這些經由組織培養所獲得的變異， Larkin 和 Scowcroft (1981) 統稱之為 "somaclonal variation"。

植物組織培養中自發突變之發生頻率較自然界中增加很多，對誘變育種之效用也無形中增加許多。造成此自發突變頻率大幅增加的原因可以歸納為：

(一)繁殖倍率高 — 在試管內繁殖之植株若有變異株發生，這些變異株又剛好更適於試管內的培養條件，往往在不知不覺中被大量增殖。

(二)繼代繁殖次數多 — 在試管內繁殖代數增加時，變異株之比率則逐漸提高。

(三)培養基成分的影響 — 培養基的組成物質如鹽類、有機物、植物荷爾蒙等，如果濃度不恰當，都被認為有促進遺傳變異發生的可能。尤其是人工合成的植物荷爾蒙如 2,4-D，BA 等，使用濃度愈高，則造成變異的機會愈大。

(四)培養條件之影響 — 有些植物細胞培養於液體和固體培養基上，其變異的比率不同。除此之

外，不同溫度或不同的繼代培養時間，亦會影響變異發生的頻率。

(五)培植體本身的影響 — 某些作物其體細胞之間的染色體數目都不盡相同，甘蔗即為很好的例子。因此培養甘蔗嫩葉所得的眾多植株，也都有不同的染色體數目，提供了選種之好機會。另外，大部分作物之不同部位也可能含有不同數目的染色體。例如莖的髓部組織常含有多倍體的細胞，以髓部組織作為培植體，則可能獲得多倍體的植株。

植物細胞或組織培養於試管內除了有較高頻率的自發突變外，用人工誘變處理之效果亦比試管外植株上的處理效果顯著。尤其是液體細胞懸浮培養，因細胞團小，用誘變劑或放射線等處理，效果均勻。如果用單倍體細胞進行誘變，則基因之變異由於無顯隱性之對立而能馬上被發覺，有利於突變個體之選拔。

三、植物組織培養技術在誘變育種上應用

誘變育種工作在試管外進行時，多半是以誘變劑處理植物的種子、幼苗、花序、花粉、莖頂或側芽等部位。此等技術之使用仍有許多不便及限制之處。例如處理效果不彰，有鑲嵌現象之植株產生等。若利用組織培養技術配合為之，則可以具有下列優點：

(一)使少數突變細胞長成新的突變株，以增加突變個體的種類及發生頻率 — 植物細胞的突變均始於單細胞，此細胞經數次分裂，數目增加，則比較容易被發覺。有些變異的細胞生長速度比正常細胞慢。例如某些植物的多倍體細胞生長緩慢，極易被正常二倍體細胞所掩蓋。且對大多數變異細胞而言，其所在的部位及因植物種類的不同，亦不容許它們有機會長成一新的團體。例如葉子上的某些變異細胞，除非像秋海棠或落地生根等植物，其葉肉細胞可以在切離母體扦插時長成植株，則很難有機會長成新的變種。此外，通常變異細胞若存在生長點部位，比在其他部位容易表現或長成新個體。因此，對大多數的突變細胞而言，都需藉助外力，使之長成植株，以供利用。例如：某黃色菊花的花瓣上出現部分紅色花瓣，將此紅色花瓣置於試管內培養，誘導植株產生，即可迅速獲得一紅花之新品種，除了花色，其園藝性狀很可能頗接近其母株。因此，植物細胞和組織培養技術，大大提高了新品種育成的機會。

(二)變異和選種方向之引導 — 通常誘變育種均很難控制細胞突變的方向。但試管內培養基的選擇，可幫助人類達成選種的方向。試管內突變的細胞除了可供育成新品種外，也可供生理和生化上的研究。因此，如何選出所需的突變細胞，成為科學家研究的重點。目前之研究及選種方向有下列數種。

1.抗病之篩選 — 以致病病原菌所產生的毒素加入培養基中，造成選種壓力，以選出抗病的細胞系和獲得抗病株。玉米抗胡麻葉枯病之抗病株的獲得即為一成功的例子。

2.抗殺草劑植株之篩選 — 殺草劑之使用能使雜草防治之成本減至最低，但也時常對作物造成傷害。 因此選擇對 2,4-D, paraquat, picloram，glyphosate 等具有抗性的新作物品種，具有極大的經濟效益。

3.抗胺基酸異構物 (analogue) 之篩選 — 此種篩選工作可以獲得蛋白質組成改善之新品種，以增加食物的營養價值。此在糧食作物之研究最多。諸如利用 5-methyltryptophan 選出色胺酸製造量高的品系；利用對 amino ethyl-cysteine 之抵抗性則可以選出能合成較多離胺酸之新細胞系。

4.抗逆境之新品種的篩選 — 舉凡植物逆境因子如高鹽、重金屬、高溫、低溫、乾旱、淹水等不良條件，都可用來作爲細胞培養之選種壓力，而選出具耐鹽、耐重金屬、耐不良環境等之新品種。

5.高產因子之篩選 — 提高作物之光合作用能力或降低光呼吸作用都可以提高產量。在菸草已很成功的利用 isonicotinic acid hydrazide 選出光合作用能力高的品系。

6.篩選有用的生化突變種 — 許多生化上的突變種爲實驗室的寵兒，可供多項研究之用。以 chlorate 選出缺 nitrate reductase 之細胞系；以各種抗生素篩選抗藥之細胞系等，都極具研究價值。

(三)減少具鑲嵌現象之突變個體發生 — 以誘變劑處理試管外之植物體，常因誘變劑無法均勻穿透到深層細胞而導致鑲嵌現象發生。例如以化學藥劑處理植物莖頂時，生長點外層之tunica layer 有部分發生突變，此等變異或可用無性繁殖方法維持，但卻不能經由種子遺傳到下一代。此乃因植物的生殖生長是源自於生長點較深層的細胞所致。但是以誘變劑處理培養之癒合組織、懸浮細胞或未完全分化的芽原體時，因藥劑處理較容易，已突變之細胞可經由器官發生 (organogenesis) 或胚發生 (embryogenesis) 而形成植株。這些植株源自於 1～數個細胞，因始源細胞數目少，故所獲得的變異株少有鑲嵌現象發生。如果數個基因型不同的細胞共同發育形成體胚或不定芽，則會導致有鑲嵌現象的植物體。

(四)便於誘變劑之處理 — 誘變劑處理具有細胞全能性(totipotency)之植物癒合組織或懸浮培養的細胞，其誘變效果較均一，且處理一個培養瓶因其內所含之細胞數目很多，因此很容易獲得大量突變細胞，這些細胞再生爲許多變異株，則使得誘變育種之效果好，既經濟、又方便。

(五)利用原生質體培養、融合及遺傳工程技術創造新的作物品種。植物細胞去掉細胞壁後乃便於引入外來之物質例如 DNA，固氮細菌、粒線體、葉綠體等，或與其他原生質體融合，故有利於改變遺傳基因之操作。尤以遺傳工程技術，可以準確地改變某一遺傳因子，而快速育成性狀優良的新品種。此種技術也可用以引入同種、同屬內所沒有的基因，因此對變種的產生，更能滿足人類的需求，此乃可以說是誘變育種的延伸及精華所在。

四、植物組織培養技術的選擇

植物組織培養的技術依培養方式的不同，可以區分爲培植體組織或癒合組織培養、細胞懸浮培養和原生質體培養等。依培植體之不同則可以區分爲生殖細胞的培養，如花粉(花藥)、胚珠(子房)的培養，或體細胞之莖頂、側芽、根、莖、葉、花序、花芽、果實、種子(胚)等部分組織的培養等。不論那一種形式和培殖體，所培養的組織、細胞、或原生質體，都必須具有芽或胚(體胚)的發生能力，才能再生植株，供選種之用。

用化學或物理方法進行誘變處理時，以處理懸浮細胞和原生質體效果最均勻，處理癒合組織則藥劑不易達到內部細胞，幸好大多數不定芽或體胚之分化可由癒合組織表面的細胞分化而來，可以不必過分考慮之。若處理莖頂或側芽時，以處理尚未長出的芽體效果較好。例如，先去掉莖頂，而在側芽預定長出的部位處理誘變劑，因此時芽原細胞數目尚少，將來長出的植株則可有鑲嵌現象發生。若培植體本身不經癒合組織而直接發生不定芽或不定胚時，

亦以處理正要發生不定芽或不定胚之培植體爲宜。

五、植物組織培養在誘變育種上應用的問題

誘變育種之步驟中，若能配合植物組織培養技術，常能獲致突破性的結果。惟目前在應用上仍受到某些限制如：

(一)許多種類的植物和其不同部位的培植體，至今尚無法經由組織培養技術獲得植株的再生。缺少此植株再生技術，則不能誘致有用的突變種。尤其是欲利用較精準和繁雜的遺傳工程技術，則非加强原生質體培養、融合和分化能力的研究不可。

(二)組織培養內變異細胞的選拔技術不足。對於生長較正常細胞緩慢的突變細胞，必須有適當的方法加以選別與分開培養，才不致遭正常細胞所抑制而終致失落。有效、快速、且針對不同遺傳變異的選拔方法，仍有待極力研究和發展。

六、結論

誘變育種之重要性與日俱增，尤其對於無性繁殖作物品種的改良更是扮演重要的角色。由於組織培養技術的研究與開發，使得誘變育種的成效如虎添翼，更具潛力。對於能控制變異的選拔方向，及生物技術和遺傳工程的運用，當更能有效地控制遺傳行爲，以滿足人類的需求。因此，在可以預見的將來，新品種的育成時間將可大幅縮短，農業生產力也可迅速提高，生產出高營養、高品質、無病蟲及農藥污染，價廉物美的食物，造福全人類。